

Эффективность комбинированных криоконсервантов, содержащих глицерин или 1,2-пропандиол, при замораживании эритроцитов

UDC 57.043:612.111:547.42/43

V.V. RAMAZANOV

Efficiency of Combined Cryopreservatives Containing Glycerol or 1,2-Propanediol During Freezing of Erythrocytes

Исследовали осмотические свойства эритроцитов, замороженных в комбинированных криоконсервантах, содержащих полимерные непроникающие (декстран, полиэтиленгликоль) и проникающие (глицерин, 1,2-пропандиол) криопротекторы. Установлено, что в эритроцитах, замороженных-отогретых в среде с полимерами, отмечается повышение скорости потока ионов H^+ и осмотической хрупкости в среде, содержащей 0,45–0,9% NaCl. Для сохранения осмотических свойств замороженных-отогретых клеток достаточно включить в среду глицерин или 1,2-пропандиол (1,2-ПД) в концентрации 5%. Полученные результаты позволяют предположить, что криопротекторная эффективность комбинированных криоконсервантов, содержащих непроникающие и проникающие криопротекторы, определяется вкладом различных по механизму действия криозащитных компонентов в суммарную защитную эффективность при замораживании и ослаблением постгипертонического стресса на клетки при размораживании.

Ключевые слова: эритроциты, комбинированные криоконсерванты, поток ионов H^+ , осмотический гемолиз.

Досліджували осмотичні властивості еритроцитів, заморожених-відігрітих у комбінованих криоконсервантах, які містять полімерні непроникаючі (декстран, поліетиленгліколь) і проникаючі (глицерин, 1,2-пропандіол) криопротектори. Встановлено, що в еритроцитах, заморожених-відігрітих у середовищі з полімерами, визначається зростання швидкості потоку іонів H^+ і осмотичної крихкості в середовищі, яке містить 0,45–0,9% NaCl. Для збереження осмотичних властивостей заморожених-відігрітих клітин достатньо включити в середовище глицерин або 1,2-пропандіол в концентрації 5%. Отримані результати дозволяють припустити, що криопротекторна ефективність комбінованих криоконсервантів, які містять непроникаючі і проникаючі криопротектори, визначається внеском різноманітних за механізмом дії криозахисних компонентів у сумарну захисну ефективність при заморожуванні та послабленям постгіпертонічного стресу на клітини при розморожуванні.

Ключові слова: еритроцити, комбіновані криоконсерванти, потік іонів H^+ , осмотичний гемоліз.

The osmotic properties of erythrocytes frozen-thawed in combined cryopreservatives, containing polymeric non-penetrating (dextran, polyethylene glycol) and penetrating (glycerol, 1,2-propane diol) cryoprotectants were studied. It was established that in erythrocytes frozen-thawed in the presence of polymers the increasing of H^+ ion flow rate and osmotic fragility in the environment with 0.45–0.9% NaCl was observed. It is sufficient to add 5% glycerol or 1,2-propane diol (1,2-PD) to the medium to preserve osmotic properties of frozen-thawed cells. The obtained results enable to suggest that cryoprotective efficiency of combined cryopreservatives, containing non-penetrating and penetrating cryoprotectants is determined both by the contribution of cryoprotective components differing by action mechanism into the sum protection efficiency during freezing-thawing and by the weakening of post-hypertonic stress in cells during freeze-thawing.

Key words: erythrocytes, combined cryopreservatives, H^+ ion flow, osmotic hemolysis.

Выбор оптимальной программы замораживания обусловлен осмотическим поведением клеток в процессе замораживания. При этом величина переохлаждения клеточных образцов не должна превышать определенной величины ($\sim 2^\circ C$) для предупреждения образования внутриклеточных кристаллов льда и ограничения осмотического градиента и градиента криопротекторов, которые являются движущей силой для выхода-входа воды в клетки. Оптимальная скорость охлаждения определяется коэффициентом проницаемости для воды и криопротектора, энергией активации, осмотически активным объемом воды в клетках и площадью их поверхности [30]. Температура начала нуклеации

Osmotic behavior of cells during freezing determines the selection of optimal freezing program. Here-with supercooling of cell samples must not exceed the certain value ($\sim 2^\circ C$) to prevent formation of intracellular ice crystals and limit the osmotic gradient being the mover for in- and outflux of water into and out of the cells. Optimal cooling rate is determined by penetration coefficient for water and cryoprotectant, activation energy, osmotically active volume of liquid in cells and their surface area [30]. Temperature of intracellular ice nucleation initiation is associated with supercooling rate of cell cytoplasm [21], concentration of penetrating cryoprotectant and cell dehydration rate [28].

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Адрес для корреспонденции: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: ramazanov.viktor@mail.ru

* Address for correspondence: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: ramazanov.viktor@mail.ru

внутриклеточного льда связана со степенью охлаждения цитоплазмы клеток [21], с концентрацией проникающего криопротектора и степенью дегидратации клеток [28].

Предполагается, что метод быстрого двухступенчатого замораживания, по сравнению с замораживанием с оптимальной постоянной скоростью, дает большую устойчивость клеток к постгипертоническому стрессу при отогреве и отмывании криопротекторов [2, 6, 13]. Данный метод обеспечивает высокую сохранность основных видов клеток костного мозга и при необходимости позволяет исключить их фракционирование [6]. Анализ литературы показывает, что упрощение ступенчатых режимов охлаждения, возможность снижения концентрации проникающего криопротектора в криоконсерванте и сохранение осмотической устойчивости клеток после отогрева связаны с использованием комбинированных сред, которые включают проникающие и непроникающие криозащитные компоненты [15–17, 26, 27].

При изучении сохранности эритроцитов после замораживания в комбинированных средах, содержащих различные полимеры (полиэтиленгликоль с м.м. 1500, поливинилпирролидон) и проникающий криопротектор 1,2-пропандиол (1,2-ПД), отмечено, что такое сочетание позволяет снизить концентрацию 1,2-ПД, повысить скорость охлаждения и получить высокую стабильность размороженных эритроцитов в ресуспенсирующей среде в течение 3-х суток после отмывания. Однако необходимо использовать гипертонические растворы для отмывания эритроцитов от криоконсерванта, так как концентрация 1,2-ПД в среде замораживания все же остается высокой (20%) [3, 4]. Если среда, в которой находятся эритроциты, содержит не более 6% глицерина, то клетки, перенесенные в изотонический раствор NaCl, остаются осмотически устойчивыми [5]. Это указывает на то, что для исключения гипертонических растворов из процедуры отмывания необходимо, чтобы криоконсервант содержал невысокую концентрацию проникающего криопротектора. Степень повреждения эритроцитов при постгипертоническом стрессе существенно зависит от температуры ресуспенсирующей среды. При температуре 35–37°C клетки наиболее устойчивы к данному повреждающему фактору [31].

Таким образом, комбинирование в среде замораживания непроникающих и проникающих криопротекторов позволит использовать невысокие концентрации последних, что обеспечит сохранение осмотической устойчивости клеток при замораживании-отогреве и позволит упростить отмывание эритроцитов после размораживания и отмывать одним изотоническим раствором NaCl при 35–37°C без использования гипертонических растворов.

It is suggested that the method of rapid two-stage freezing exhibits higher cell resistance to post-hypertonic stress during thawing and removing cryoprotectants if compared with the freezing with "optimal" constant rate [2, 6, 13]. This method provides a high survival of major types of bone marrow cells and enables to exclude their fractionation if required [6]. The analysis of related papers shows that simplification of stepwise cooling regimens, possible reduction of penetrating cryo-protectant concentration in cryopreservative media as well as preservation of post-thaw cell osmotic resistance are associated with the using of combined media comprising penetrating and non-penetrating cryoprotective components [15–17, 26, 27].

When studying erythrocyte survival after freeze-thawing in combined media containing various polymers (polyethylene glycol, polyvinyl pyrrolidone) and penetrating cryoprotectant 1,2-propane diol (1,2-PD) it was noted that these combinations enabled to reduce the concentration of 1,2-PD, to increase cooling rate and to obtain a high stability of frozen-thawed erythrocytes in re-suspending medium for 3 days after washing. However, it is necessary to use hypertonic solutions to wash the erythrocytes from cryopreservative, since the concentration of 1,2-PD in the freezing medium remain high (20%) [3, 4]. If the medium with erythrocytes contains less than 6% of glycerol the cells transferred to NaCl isotonic solution remain osmotically resistant [5]. It denotes that for excluding the hypertonic solutions from washing procedure it is necessary to supplement the cryopreservative medium with low concentration of penetrating cryoprotectant. Erythrocyte damage rate under hypertonic stress essentially depends on temperature of re-suspending medium. The cells are most resistant to this damage factor under 35–37°C [31].

Thus, the combining of non-penetrating and penetrating cryoprotectants in freezing medium enables to use low concentrations of the latter that provides preservation of osmotic resistance of cells during freeze-thawing and allows to simplify the procedure of erythrocyte washing after freeze-thawing and apply only NaCl isotonic solution at 35–37°C without hypertonic ones.

The research aim was to study the cryoprotective efficiency of combined cryopreservatives containing polymers and low concentrations of penetrating cryoprotectants.

Materials and methods

Following substances were used in the research: NaCl ('chemically pure' grade), Na₂SO₄ ('chemically pure' grade), sucrose ('pure for analysis' grade), polyethylene glycols with molecular mass of 1500, 2000 (PEG-1500 and PEG-2000, Merck, Germany); dextrans with molecular mass of 10000 (D-10000, Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) and 35000 (D-35000, Serva,

Цель работы – исследование криопротекторной эффективности комбинированных криоконсервантов, содержащих полимеры и невысокие концентрации проникающих криопротекторов.

Материалы и методы

В работе использовали NaCl (х. ч.); Na₂SO₄ (х. ч.); сахарозу (ч. д. а.); полиэтиленгликоли с молекулярной массой 1500, 2000 (ПЭГ-1500, ПЭГ-2000, “Merck”, Германия); декстраны с молекулярной массой 10000 (Д-10000, “Pharmacia Fine Chemicals”, Швеция) и 35000 (Д-35000, “Serva”, Германия); глицерин (Россия); 1,2-пропандиол (“Химпром”, Россия). Среды замораживания готовили на изотоническом растворе (0,3% NaCl и 6,85 % сахарозы). Каждый криоконсервант содержал 20% полимера или 20% полимера + 5% проникающего криопротектора.

Эритроциты человека получали из донорской крови 2-й группы четырехкратным отмыванием 0,9% раствором NaCl. Образцы эритроцитов в средах замораживания объемом 1 мл и с гематокритом 40% в полиэтиленовых ампулах инкубировали 40 мин при 25°C, погружали в жидкий азот (–196°C) и выдерживали 30 мин, затем переносили на водяную баню при 40°C на 3 мин. После отогрева 1 мл размороженной суспензии при температуре 37°C, медленно перемешивая, разводили изотоническим раствором NaCl (0,9%) в 10 раз в течение не менее 30 с и центрифугировали при 3000 об/мин, 5 мин с последующим удалением надосадочной жидкости. Данную процедуру повторяли. После этого без учета скорости разведения осадка эритроцитов клетки дополнительно отмывали 3 раза изотоническим раствором NaCl (0,9%) при 37°C.

Осмотический гемолиз эритроцитов исследовали в среде, содержащей 10 мМ трис-буфер с pH 7,4 и NaCl с различными концентрациями (0,09–0,9%); 1 мл суспензии клеток с гематокритом 0,6% инкубировали 15 мин при 25°C, далее центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 мин.

Степень гемолиза вычисляли после спектрофотометрического определения количества гемоглобина в супернатанте образцов, измеряя оптическую плотность при длине волны 543 нм [19]:

$$[A_1/A_2] \times 100,$$

где A_1 – оптическая плотность супернатанта экспериментального образца; A_2 – оптическая плотность при полном гемолизе контрольного образца.

Транспорт ионов H⁺ в эритроцитах в сульфатной среде исследовали в термостатируемой ячейке (37°C) с pH-электродом при постоянном перемешивании клеточной суспензии. Изменения pH внешней среды регистрировали при помощи самописца. В ячейку вносили последовательно 2 мл

Germany); glycerol (Russia); 1,2-propane diol (Khimprom, Russia). The freezing media were prepared on the base of isoosmotic solution (0.3% NaCl and 6.85% sucrose). Each cryopreservative medium contained 20% polymeric substance or 20% polymeric substance + 5% penetrating cryoprotectant.

Human erythrocytes were derived from donor blood of 2nd group by 4-fold washing with 0.9% NaCl solution. Erythrocytes were re-suspended in 1 ml of freezing media to reach 40% hematocrit and incubated in polyethylene ampoules for 40 min at 25°C, plunged into liquid nitrogen (–196°C) and left for 30 min, then transferred to water bath at 40°C for 3 min. After thawing 1 ml of frozen-thawed suspension was diluted 10 times with NaCl isotonic solution (0.9%) at 37°C with slow agitation for at least 30 sec, and then centrifuged at 3,000 rpm for 5 min with the following removal of supernatant. This procedure was repeated. Afterwards the cells were additionally washed thrice with NaCl isotonic solution (0.9%) at 37°C without considering the erythrocyte sediment dilution rate.

Osmotic hemolysis of erythrocytes was studied in the medium, containing 10 mM tris-buffer, pH 7.4, and NaCl with different concentrations (0.09–0.9%); 1 ml of cell suspension with 0.6% hematocrit was incubated for 15 min at 25°C, and then centrifuged at 3,000 rpm for 3 min.

Hemolysis percentage was calculated after spectrophotometrical assessing of hemoglobin amount in supernatant of sample by measuring the optical density at 543 nm:

$$[A_1/A_2] \times 100,$$

where A_1 is optical density of supernatant of experimental sample; A_2 is optical density after complete hemolysis in the control sample.

Transport of H⁺ ions in erythrocytes in sulfate medium was investigated in thermostated well (37°C) with pH electrode and constant agitation of cell suspension. The changes of environmental pH were recorded. Two ml of 0.15 mol/l NaCl solution and 50 ml of erythrocyte sediment were stepwise introduced into the well (to reach 2% final hematocrit). Herewith pH value of cell suspension usually made 6.6–6.7, that corresponded to pH of extracellular medium during storage of blood [10]. To investigate H⁺ ion transport in erythrocytes 2 ml of 0.11 mol/l Na₂SO₄ solution were introduced into thermostated well. Correction of solution's pH to reach 6.6–6.7 values was performed using NaOH or H₂SO₄. Thereafter 50 ml of erythrocyte sediment (80% hematocrit) were introduced into the well and the dynamics of pH changes was recorded.

During introduction of erythrocytes into Na₂SO₄ isotonic solution without buffer components a two-phase alteration of extracellular medium pH (acidification and following alkalization) occurred. This altera-

0,15 моль/л NaCl и 50 мкл эритроцитарного осадка (конечный гематокрит в ячейке 2%). При этом значение pH клеточной суспензии обычно составляло 6,6–6,7, что соответствует pH внеклеточной среды при хранении крови [10]. Для исследования транспорта ионов H^+ в эритроцитах вносили 2 мл раствора 0,11 моль/л Na_2SO_4 в термостатируемую ячейку. Используя раствор NaOH или H_2SO_4 , осуществляли коррекцию pH среды до значений 6,6–6,7. После этого в ячейку вносили 50 мкл осадка эритроцитов (80% гематокрита) и регистрировали динамику изменения pH среды.

При внесении эритроцитов в изотонический раствор Na_2SO_4 , не содержащий буферных компонентов, происходит двухфазное изменение pH внешней среды: закисление с последующим защелачиванием. Такое изменение pH связано с обменом внутриклеточного Cl^- на внеклеточный SO_4^{2-} [23].

На рис. 1 представлена характерная экспериментальная кривая установления стационарного значения pH суспензии эритроцитов в изотонической сульфатной среде (0,11 моль/л Na_2SO_4). Начальное значение pH ~6,70 (показание pH суспензии эритроцитов в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl), конечное значение pH ~6,75–6,85.

Используя экспериментальные параметры t_{max} , $pH_{t_{max}}$, pH^0 (рис. 1), по уравнениям [8]

$$t_{max} = \ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right)(k_2 - k_1)$$

$$\text{и } [H]_{t_{max}} = [H]^0 \left[\left(\frac{k_2}{k_1}\right)^{1/(1-k_2/k_1)} - \left(\frac{k_2}{k_1}\right)^{(k_2-k_1)/(1-k_2/k_1)} \right]$$

можно рассчитать константы скорости k_1 и k_2 (выход и вход ионов H^+ соответственно). Поскольку в эксперименте регистрируются изменения pH внешней среды, для вычисления констант скоростей концентрацию ионов H^+ необходимо представить как изменение их концентраций во внешней среде:

$$[H]^0 = [H]_0 - [H]_\infty;$$

$$[H]_{t_{max}} = [H]_{max} - [H]_0,$$

где $[H]_0$, $[H]_{max}$, $[H]_\infty$ – концентрации ионов H^+ во внешней среде суспензии эритроцитов в начале эксперимента, в момент t_{max} и при максимальном закислении после внесения эритроцитов в среду, содержащую 0,3 моль/л сахарозы.

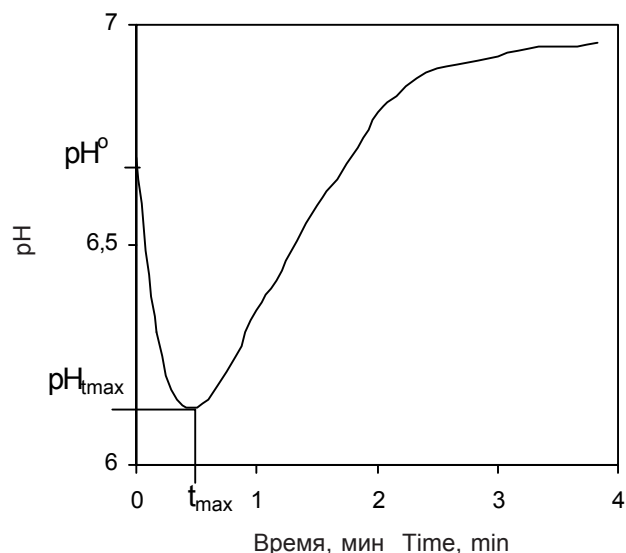


Рис. 1. Изменение pH раствора, содержащего 2 мл 0,11 моль/л Na_2SO_4 , после внесения 50 мкл осадка эритроцитов.

Fig. 1. Change of pH solution, containing 2 ml of 0.11 mol/l Na_2SO_4 after introduction of 50 µl erythrocyte sediment.

tion of pH is associated with interchange of intracellular Cl^- with extracellular SO_4^{2-} [23].

Fig. 1 shows characteristic experimental curve of reaching the pH stable value of erythrocyte suspension in isotonic sulfate medium (0.11 mol/l Na_2SO_4). The initial value of pH was ~6.70 (pH indication of erythrocyte suspension in the medium, containing 0.15 mol/l NaCl), the final value of pH was ~6.75–6.85.

Using the experimental parameters t_{max} , $pH_{t_{max}}$, pH^0 (Fig. 1) and the equations [8]

$$t_{max} = \ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right)(k_2 - k_1), \text{ and}$$

$$[H]_{t_{max}} = [H]^0 \left[\left(\frac{k_2}{k_1}\right)^{1/(1-k_2/k_1)} - \left(\frac{k_2}{k_1}\right)^{(k_2-k_1)/(1-k_2/k_1)} \right]$$

it is possible to calculate the rate constants, k_1 and k_2 (outflux and influx of H^+ ions, accordingly). Whereas the pH changes in the external medium are recorded in the experiment the calculation of transport constants requires to represent H^+ ion concentrations as the changes of their concentrations in the external media:

$$[H]^0 = [H]_0 - [H]_\infty;$$

$$[H]_{t_{max}} = [H]_{max} - [H]_0,$$

Движение ионов H^+ через мембрану эритроцитов в сульфатной среде сопряжено с транспортом анионов Cl^- и SO_4^{2-} [23]. Однонаправленный поток ионов H^+ вычисляли после преобразования формулы [9]:

$$J = k \cdot d \cdot C_i \text{ (ммоль} \cdot (3,1 \times 10^{13} \text{ кл} \cdot \text{мин})^{-1}),$$

где k – константа скорости, c^{-1} ; d – отношение объема клеточной воды (л) к сухому остатку эритроцитов, кг; C_i – концентрация внутриклеточного Cl^- (ее замещали на ΔH – изменение концентрации ионов H^+ во внешней среде при обмене Cl^- на SO_4^{2-}). Количество $3,1 \times 10^{13}$ нормальных клеток соответствует 1 кг сухого остатка эритроцитов с площадью мембран $4,4 \times 10^7 \text{ см}^2$ [9]. Поэтому формула для потока ионов H^+ имеет вид:

$$J = k \cdot d \cdot \Delta H \text{ (ммоль} \cdot (\text{кг} \cdot \text{с})^{-1}).$$

Статистические расчеты производили на основе результатов, полученных на эритроцитах от 5 доноров. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни при $p < 0,05$ [1].

Результаты и обсуждение

Замораживание-отогрев эритроцитов в среде с декстранами вызывает 36,7 и 40,4% гемолиза при использовании Д-35000 и Д-10000 соответственно и приводит к повышению скорости потоков для ионов H^+ в негемолизированных клетках. Включение в данные среды глицерина или 1,2-ПД существенно снижает степень повреждения эритроцитов, при этом показатели потоков ионов H^+ для остатка клеток незначительно отличаются от величин для интактных клеток (табл. 1).

Результаты исследования осмотического гемолиза эритроцитов представлены на рис. 2. После их замораживания-отогрева с декстранами отмечаются повышение осмотической хрупкости в солевой среде при концентрации $NaCl$ 0,45–0,9%, а в интервале концентраций соли 0,09–0,4% – повышение осмотической устойчивости эритроцитов по сравнению с интактными клетками. Замораживание-отогрев эритроцитов в среде с декстранами в сочетании с глицерином или 1,2-ПД не приводит к значительному изменению кривых осмотического гемолиза по сравнению с интактными клетками. Небольшое различие между кривыми отмечается при концентрации $NaCl$ 0,18–0,3%.

Замораживание-отогрев эритроцитов с ПЭГ вызывает 55 и 64% гемолиза для ПЭГ-2000 и ПЭГ-1500 соответственно, а также увеличение

where $[H]_0$, $[H]_{max}$, $[H]_{\infty}$ are the H^+ ion concentrations in the external medium at the start of the experiment, in the moment of t_{max} and in the moment of maximum acidification after introduction of erythrocytes into the medium, containing 0.3 mol/l sucrose.

Transport of H^+ ions through erythrocyte membrane in sulfate medium is coupled with transport of Cl^- and SO_4^{2-} anions. Unidirectional flow of H^+ ions was calculated after transformation of the formula [9]:

$$J = k \cdot d \cdot C_i \text{ (mmol} \cdot (3,1 \times 10^{13} \text{ cells} \cdot \text{min})^{-1}),$$

where k is kinetic constant, sec^{-1} ; d is ratio between volume of cell liquid (l) and erythrocyte dry weight, kg; C_i is concentration of intracellular Cl^- (it would be substituted by ΔH , the change of H^+ ion concentration in external medium during interchange of Cl^- with SO_4^{2-}).

The number of normal cells 3.1×10^{13} corresponds to 1 kg of erythrocyte dry weight and with membrane surface of $4.4 \times 10^7 \text{ cm}^2$ [9]. Therefore the formula for H^+ ion flow is:

$$J = k \cdot d \cdot \Delta H \text{ (mmol} \cdot (\text{kg} \cdot \text{sec})^{-1}).$$

The statistical processing was performed on the base of results obtained in erythrocytes from 5 donors. The data are presented as mean \pm standard error. Non-parametric Mann-Whitney's method at $p < 0.05$ was used to determine statistical significance of the results [1].

Results and discussion

Freeze-thawing of erythrocytes in the medium with dextrans D-35000 and D-10000 caused 36.7 and 40.4% hemolysis, correspondingly, and resulted in increased H^+ ion flow rate in non-hemolyzed cells. Introduction of glycerol or 1,2-PD into these media significantly decreased erythrocyte damage level, herewith the values of H^+ ion flows in remaining cells differed insignificantly from the values of the intact cells (Table 1).

The research results of erythrocyte osmotic hemolysis are presented in Fig. 2. After freeze-thawing of the cells with dextrans the increasing of osmotic fragility in saline media with 0.45–0.9% $NaCl$ was observed, and within the range of 0.09–0.4% concentration there was found the increased erythrocyte osmotic resistance if compared with the intact cells. Erythrocyte freeze-thawing in the medium with dextrans in combination with glycerol or 1,2-PD did not result in significant changes in osmotic hemolysis curves if compared with the intact cells. A little difference among the curves was observed at 0.18–0.3% $NaCl$ concentration.

Erythrocyte freeze-thawing with PEG-2000 and PEG-1500 resulted in 55 and 64% hemolysis, correspondingly, as well as the increasing of H^+ ion flow rate in non-hemolyzed cells. Introduction into these media of glycerol or 1,2-PD also reduced erythrocyte

Таблица 1. Степень повреждения и скорость потока ионов H^+ в эритроцитах, замороженных-отогретых в среде с декстранами (концентрация 20%) в комбинации с глицерином или 1,2-ПД (концентрация 5%)
Table 1. Damage degree and H^+ ion flow rate in erythrocytes frozen-thawed in the medium with dextrans (20% concentration) in combination with glycerol or 1,2-PD (5% concentration)

Среды замораживания Freezing media	Гемолиз после замораживания-отогрева и отмывания, % Hemolysis after freeze-thawing and washing, %	Поток ионов H^+ в эритроцитах H^+ ion flow in erythrocytes	
		$J_{out} \times 10^7$ МОЛЬ/КГ/С (из клетки) mol/kg/sec (out of cell)	$J_{in} \times 10^7$ МОЛЬ/КГ/С (в клетку) mol/kg/sec (into cell)
Интактные клетки Intact cells	—	5,43 ± 0,61	4,00 ± 0,52
Д-35000 D-35000	36,7 ± 4,0	7,97 ± 1,10*	5,89 ± 0,83#
Д-35000 + глицерин D-35000 + glycerol	22 ± 4,4*	6,08 ± 0,81	4,97 ± 0,70
Д-35000 + 1,2-ПД D-35000 + 1,2-PD	20 ± 4,1*	5,95 ± 0,74	4,84 ± 0,71
Д-10000 D-10000	40,4 ± 5,6	8,17 ± 1,05*	6,13 ± 0,82#
Д-10000 + глицерин D-10000 + glycerol	22,4 ± 4,6*	6,33 ± 0,75	5,12 ± 0,72
Д-10000 + 1,2-ПД D-10000 + 1,2-PD	20,5 ± 5,3*	5,97 ± 0,73	4,85 ± 0,58

Примечание: * – статистически достоверно по сравнению с соответствующими показателями гемолиза эритроцитов при замораживании в среде без проникающего криопротектора ($p < 0,05$); # – статистически достоверно по сравнению с интактными клетками ($p < 0,05$).

Note: * – statistically significant if compared with appropriate indices of erythrocyte hemolysis during freezing in the medium without penetrating cryoprotectant ($p < 0.05$); # – statistically significant if compared with the intact cells ($p < 0.05$).

скорости потока ионов H^+ в негемолизированных клетках. Включение в указанные среды глицерина или 1,2-ПД также снижает степень повреждения эритроцитов, при этом скорость потоков ионов H^+ для остатка клеток существенно не повышается по сравнению с интактными клетками (табл. 2).

Замораживание-отогрев эритроцитов с ПЭГ в комбинации с проникающими криопротекторами приводит к незначительным изменениям кривых осмотического гемолиза эритроцитов по сравнению с интактными клетками (рис. 3). Степень повреждения эритроцитов после замораживания-отогрева в средах с декстранами (табл. 1) ниже, чем в средах с ПЭГ (табл. 2).

Таким образом, эритроциты, замороженные-отогретые с полимерными непроникающими криопротекторами и отмывые изотоническим раствором NaCl, имеют необычные осмотические свойства: в них значительно повышается скорость потока ионов H^+ (табл. 1 и 2), снижается осмотическая устойчивость в диапазоне концентрации NaCl 0,45–0,9%, а в интервале концентрации NaCl 0,09–0,4% повышается устойчивость замороженных-отогретых эритроцитов (рис. 2 и 3) по сравнению с интактными клетками. Включение в криоконсервант глицерина или 1,2-ПД способствует сохранению удовлетворительных осмотических свойств

damage rate, and H^+ ion flow rate in remaining cell was not significantly increased if compared with the intact cells (Table 2).

Erythrocyte freeze-thawing with PEG in combination with penetrating cryoprotectants resulted in insignificant changes of erythrocyte osmotic hemolysis curves if compared with the intact cells (Fig. 3). Erythrocyte damage rate after freeze-thawing in the media with dextrans (Table 1) was lower, than in the media with PEG (Table 2).

Thus, the erythrocytes frozen-thawed with polymeric non-penetrating cryoprotectants and washed with NaCl isotonic solution have unusual osmotic properties such as: H^+ ion flow rate is significantly increased in these cells (Tables 1 and 2), osmotic resistance within the range of 0.45–0.9% NaCl concentration is reduced, and within the range of 0.09–0.4% NaCl concentration the resistance of frozen-thawed erythrocytes is increased if compared with the intact cells. Introduction of glycerol or 1,2-PD into cryopreservation media contributes to preservation of adequate osmotic properties of frozen-thawed erythrocytes. This corresponds to the increasing of frozen-thawed cell survival (Tables 1 and 2). The obtained results testify to the fact that combination of non-penetrating cryoprotectants with penetrating ones reveals the effective cryoprotective peculiarities of resulted mixture.

Таблица 2. Степень повреждения и скорость потока ионов H^+ в эритроцитах, замороженных в среде с полиэтиленгликолями (конц. 20%) в комбинации с глицерином или 1,2-ПД (конц. 5%)
Table 2. Damage degree and H^+ ion flow rate in erythrocytes frozen in the medium with polyethylene glycols (20% concentration) in combination with glycerol or 1,2-PD (5% concentration)

Среды замораживания Freezing media	Гемолиз после замораживания-отогрева и отмывания, % Hemolysis after freeze-thawing and washing, %	Поток ионов H^+ в эритроцитах H^+ ion flow in erythrocytes	
		$J_{out} \times 10^7$ моль/кг/с (из клетки) mol/kg/sec (out of cell)	$J_{in} \times 10^7$ моль/кг/с (в клетку) mol/kg/sec (into cell)
Интактные клетки Intact cells	—	5,43 ± 0,61	4,00 ± 0,52
ПЭГ-2000 PEG-2000	55,0 ± 4,7	8,06 ± 1,14*	6,07 ± 0,85*
ПЭГ-2000 + глицерин PEG-2000 + glycerol	28,0 ± 5,3*	6,20 ± 0,83	5,01 ± 0,70
ПЭГ-2000 + 1,2-ПД PEG-2000 + 1,2-PD	29,3 ± 4,2*	6,03 ± 0,81	4,90 ± 0,63
ПЭГ-1500 PEG-1500	64,0 ± 3,0	8,22 ± 0,98*	6,23 ± 0,88*
ПЭГ-1500 + глицерин PEG-1500 + glycerol	42,8 ± 4,6*	6,60 ± 0,82	5,15 ± 0,68
ПЭГ-1500 + 1,2-ПД PEG-1500 + 1,2-PD	40,4 ± 5,2*	6,14 ± 0,80	5,11 ± 0,71

Примечание: * – статистически достоверно по сравнению с соответствующими показателями гемолиза эритроцитов при замораживании в среде без проникающего криопротектора ($p < 0,05$), # – статистически достоверно по сравнению с интактными клетками ($p < 0,05$).

Note: * – statistically significant if compared with appropriate indices of erythrocyte hemolysis during freezing in the medium without penetrating cryoprotectant ($p < 0.05$), # – statistically significant if compared with the intact cells ($p < 0.05$).

замороженных эритроцитов. Это соотносится с повышением сохранности замороженных клеток (табл. 1 и 2). Полученные результаты свидетельствуют, что при сочетании непроникающих криопротекторов с проникающими проявляется эффективное криопротекторное свойство комбинированного состава.

Известно, что внесение эритроцитов в сульфатную среду вызывает выход ионов H^+ с последующим их входом в клетку. Выход ионов H^+ происходит вследствие функционирования цикла Якобса-Стюарта, тогда как их вход связан с транспортом сульфата в обмен на хлорид [23].

Работа указанного цикла зависит от согласованного функционирования Cl^-/HCO_3^- -обменника и фермента карбоангидразы, который может находиться в связанном состоянии с цитоплазматическим фрагментом анионного обменника [25]. Степень и характер ассоциации обменника с карбоангидразой могут определять согласованность и скорость обмена ионов H^+ , Cl^- и SO_4^{2-} между клеткой и средой [25]. Можно предположить, что замораживание эритроцитов в средах с полимерами приводит к нарушению структуры мембраны, которое включает изменение взаимной локализации компонентов цикла Якобса-Стюарта с последующей активацией транспорта ионов H^+ . Однако, вероятнее всего, повышение скорости потока ионов

It is known that erythrocyte introduction into sulfate medium induces H^+ ion outflux and their following influx into the cell. Outflux of H^+ ion occurs due to functioning of Jacobs-Stewart cycle whereas their influx is associated with sulfate transport during interchange with chloride [23].

The functioning of the mentioned above cycle depends on coupled action of Cl^-/HCO_3^- -exchanger and carbonic anhydrase enzyme, which could be bound with cytoplasmic fragment of anion exchanger [25]. The degree and character of bounding of exchanger with carbonic anhydrase could determine a coupling and rate of H^+ , Cl^- and SO_4^{2-} ion exchange between cell and medium [25]. It may be suggested that erythrocyte freeze-thawing in the media with polymers results in damage of membrane structures, including the change of mutual localization of Jacobs-Stewart cycle components with the following activation of H^+ ion transport. However, most likely the increasing of H^+ ion flow rate in frozen-thawed erythrocytes is associated with the impaired barrier function of membranes, this increase is less significant if cryopreservation medium additionally contains glycerol or 1,2-PD (Table 1 and 2).

A higher osmotic resistance of frozen-thawed erythrocytes if compared with the intact cells within the range of hypotonic concentrations of NaCl was found after freeze-thawing in the medium with trehalose or dextran [20], but not with glycerol [20, 29]. It denotes that

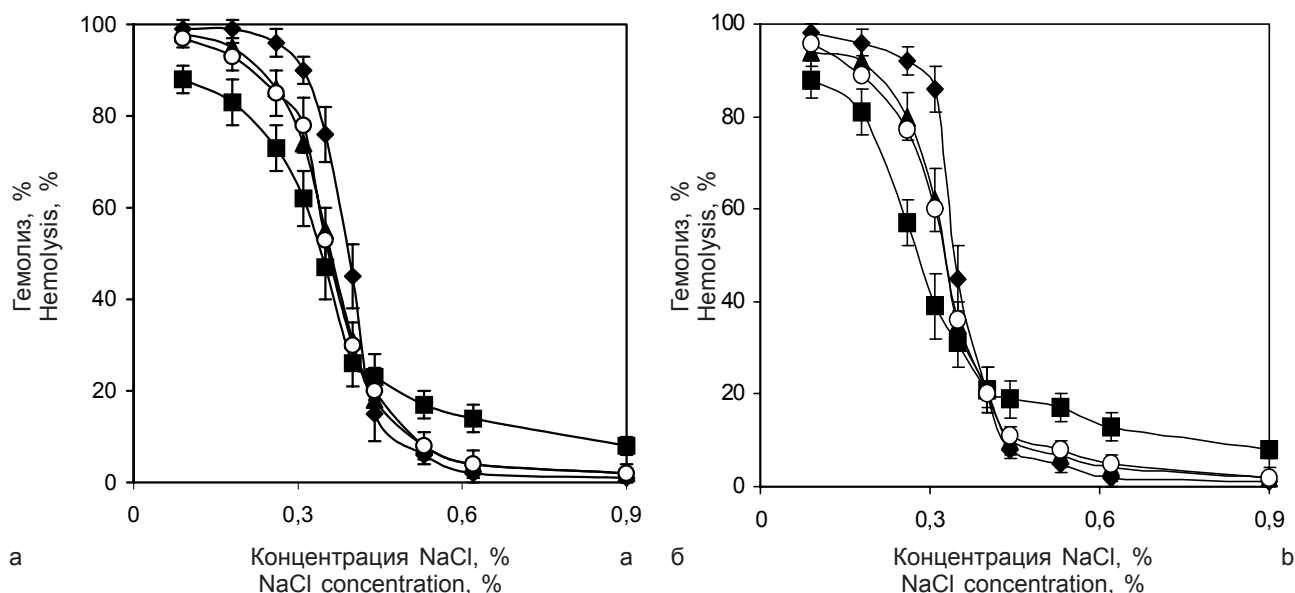


Рис. 2. Осмотический гемолиз эритроцитов, замороженных в среде, содержащей: а – 20% Д-35000 (▲, ○, ■) + 5% глицерина (▲) или 5% 1,2-ПД (○); б – 20% Д-10000 (▲, ○, ■) + 5% глицерина (▲) или 5% 1,2-ПД (○); ◆ – интактные клетки.

Fig. 2. Osmotic hemolysis of erythrocytes frozen in the medium, containing: a – 20% D-35000 (▲, ○, ■) + 5% glycerol (▲) or 5% 1,2-PD (○); b – 20% D-10000 (▲, ○, ■) + 5% glycerol (▲) or 5% 1,2-PD (○); ◆ – intact cells.

H^+ в замороженных-отогретых эритроцитах связано с нарушением барьерной функции мембран, уровень его повышения уменьшается, если криоконсервант дополнительно включает глицерин или 1,2-ПД (табл. 1 и 2).

Большая осмотическая устойчивость замороженных-отогретых эритроцитов, по сравнению с интактными клетками, в интервале гипотонических концентраций NaCl выявлена при замораживании-отогреве в среде с трегалозой или декстраном [20], но не с глицерином [20, 29]. Это указывает на то, что полученный эффект выявляется только после замораживания-отогрева эритроцитов в средах с непроницающими криопротекторами и, возможно, связан с нарастанием градиента концентрации непроницающих криопротекторов на мембранах клеток при замораживании-отогреве. Эритроциты, замороженные-отогретые в среде с непроницающими и проникающими криопротекторами по сравнению со средой, содержащей только непроницающий криопротектор, по осмотической хрупкости более подобны интактным эритроцитам (рис. 2 и 3). Исследование осмотического гемолиза показывает, что включение в среды с полимерами проникающих криопротекторов предупреждает значительные изменения осмотических свойств замороженных-отогретых эритроцитов.

Согласно данным литературы [22] глицерин в концентрации 5% эффективен при замораживании эритроцитов до $-30^{\circ}C$, однако при замораживании до $-130^{\circ}C$ его криопротекторная активность резко

the obtained effect is revealed only after freeze-thawing of erythrocytes in the media with non-penetrating cryoprotectants and is likely associated with increase in concentration gradient of non-penetrating cryoprotectants on cell membranes during freezing. The osmotic fragility of the erythrocytes frozen-thawed in the medium with non-penetrating and penetrating cryoprotectants is more similar to the intact erythrocytes if compared with the cells frozen-thawed in the medium containing only non-penetrating cryoprotectant (Fig. 2 and 3). The studying of osmotic hemolysis showed, that introduction of penetrating cryoprotectants into the media with polymeric cryoprotectants prevented significant changes in osmotic properties of frozen-thawed erythrocytes.

According to Rapatz and Luyet [22] 5% glycerol concentration is effective when freezing erythrocytes down to $-30^{\circ}C$, however, when freezing the cells down to $-130^{\circ}C$ its cryoprotective activity sharply reduces. Glucose and sucrose are effective when freezing erythrocytes down to $-40...-130^{\circ}C$. Herewith the protective activity of polyvinylpyrrolidone (PVP) is between the ones of penetrating cryoprotectants and sugars [22]. Such penetrating cryoprotectants as glycerol protect cells during slow freezing [18] and non-penetrating ones act during rapid freezing [12]. Probably the combination of glycerol with glucose, sucrose and polymers like PVP in cryopreservation medium represents a sufficient cryoprotective effect. This suggestion conforms with the obtained results on a degree of damage, H^+ ion flow rate and osmotic hemolysis of erythrocytes

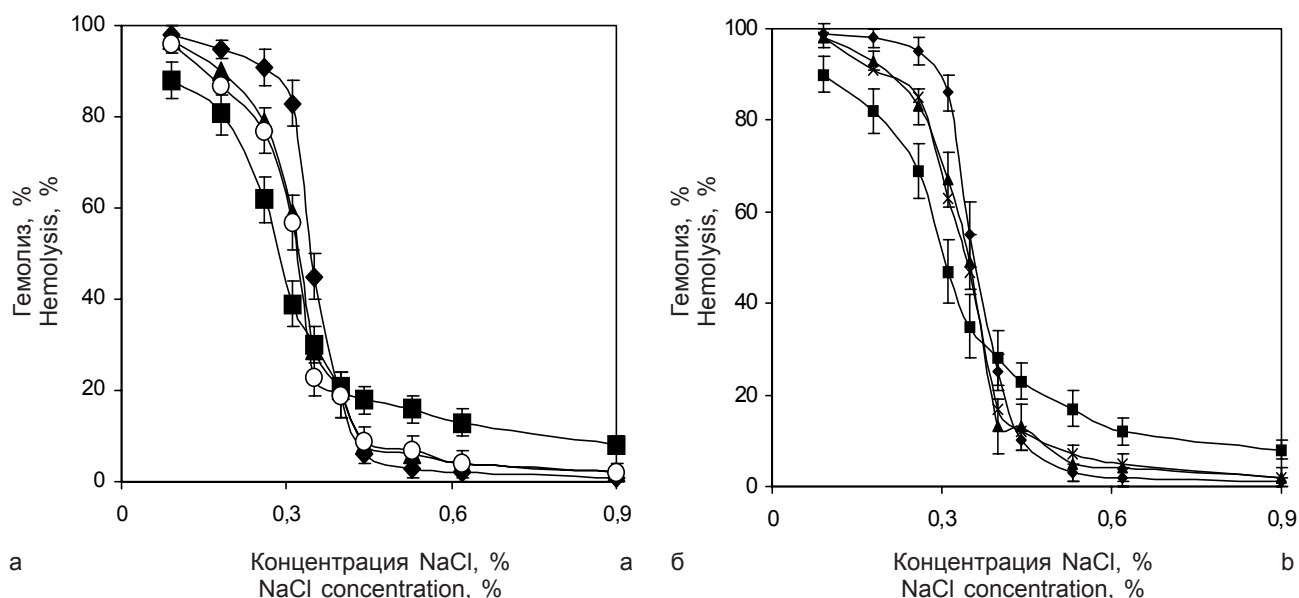


Рис. 3. Осмотический гемолиз эритроцитов, замороженных в среде, содержащей: а – 20% ПЭГ-2000 (▲, ○, ■) + 5% глицерина (▲) или 5% 1,2-ПД (○); б – 20% ПЭГ-1500 (▲, ○, ■) + 5% глицерина (▲) или 5% 1,2-ПД (○); ◆ – интактные клетки.

Fig. 3. Osmotic hemolysis of erythrocytes frozen in the medium, containing: a – 20% PEG-2000 (▲, ○, ■) + 5% glycerol (▲) or 5% 1,2-PD (○); b – 20% PEG-1500 (▲, ○, ■) + 5% glycerol (▲) or 5% 1,2-PD (○); ◆ – intact cells.

снижается. Глюкоза и сахароза эффективны при замораживании эритроцитов до температуры $-40...-130^{\circ}\text{C}$. При этом поливинилпирролидон (ПВП) по защитной активности занимает промежуточное положение между проникающими криопротекторами и сахарами [22]. Такие проникающие криопротекторы, как глицерин, защищают клетки при медленном охлаждении [18], непроникающие – при быстром [12]. Возможно, сочетание в криоконсерванте глицерина с глюкозой, сахарозой и полимерами, подобными ПВП, дает хороший криозащитный эффект. Это предположение согласуется с полученными результатами относительно степени повреждения, скорости потока ионов H^+ и осмотического гемолиза эритроцитов, замороженных в среде, содержащей сахарозу, полимер и проникающий криопротектор (глицерин или 1,2-ПД) (табл. 1 и 2; рис. 2 и 3). Сочетание в криоконсерванте глицерина или 1,2-ПД с сахарозой устраняет эффект “упаковки”, вероятно, за счет ослабления постгипертонического стресса эритроцитов в ходе быстрого замораживания-отогрева [7]. Устранение эффекта “упаковки” сопровождается сохранением осмотической хрупкости замороженных-отогретых эритроцитов как при повышении концентрации глицерина в среде замораживания (от 20 до 40%), так и при включении в криоконсервант с глицерином (20%) мембранотропных реагентов [29]. Полученные результаты по сохранению осмотических свойств эритроцитов, замороженных-отогретых в

frozen-thawed in the medium containing sucrose, polymeric substance and penetrating cryoprotectant (glycerol or 1,2-PD) (Tables 1 and 2; Fig. 2 and 3). The combination of glycerol or 1,2-PD with sucrose in cryopreservation medium eliminates the "packing" effect probably due to the weakening of post-hypertonic stress action in erythrocytes during rapid freeze-thawing [7]. Elimination of "packing" effect is accompanied by preservation of osmotic fragility in frozen-thawed erythrocytes both when increasing glycerol concentration in the freezing medium (from 20 to 40%) and when introduce membrane trophic reagents [29] into cryopreservation medium with glycerol (20%). The obtained results about preservation of osmotic properties of erythrocytes frozen-thawed in combined media containing sucrose, polymeric substance (dextran or PEG) and penetrating cryoprotectant (glycerol or 1,2-PD) (Table 1 and 2; Fig. 2 and 3) conform with the observations of Wagner *et al.* [29] and confirm the suggestion that elimination of "packing" effect is triggered by the weakening of post-hypertonic stress action in cells during freeze-thawing.

The combining of hydroxyethyl starch (HES) with DMSO in cryopreservation medium provides the preservation of functional indices during freeze-thawing of stem cells from peripheral blood [11], bone marrow cells [16, 26, 27], granulocytes [14], lymphocytes [24], hemopoietic cells of cord blood [15] and human pancreas cells [17]. The application of such a combined cryopreservative simplifies the freezing procedure [15–

комбинированных средах, содержащих сахарозу, полимер (декстран или ПЭГ) и проникающий криопротектор (глицерин или 1,2-ПД) (табл. 1 и 2; рис. 2 и 3), согласуются с данными Wagner С.Т. и соавт. [29] и подтверждают предположение, что устранение эффекта “упаковки” определяется ослаблением постгипертонического стресса клеток в процессе замораживания-отогрева.

Сочетание гидроксиэтилированного крахмала (ГЭК) с ДМСО в криоконсерванте обеспечивает сохранение функциональных показателей при замораживании стволовых клеток периферической крови [11], клеток костного мозга [16, 26, 27], гранулоцитов [14], лимфоцитов [24], гемопоэтических клеток кордовой крови [15] и клеток поджелудочной железы человека [17]. Применение данного комбинированного криоконсерванта упрощает процедуру замораживания [15–17, 26, 27]. Вероятно, это связано с тем, что использование комбинации ГЭК и ДМСО позволяет избежать значительного переохлаждения клеточных образцов при замораживании [16, 27]. Данные литературы свидетельствуют о том, что защитная эффективность различных криопротекторов проявляется в разных интервалах отрицательных температур и при различных скоростях охлаждения. Можно предположить, что в комбинированной среде каждый криопротектор будет проявлять защитное свойство при “своих” низкотемпературных условиях, но в итоге комбинированный криоконсервант будет обеспечивать аддитивную криопротекторную эффективность. Кроме того, комбинированные криоконсерванты ослабляют постгипертонический стресс при размораживании, что обеспечивает сохранение удовлетворительных осмотических свойств клеток.

Таким образом, эритроциты, отмытые изотоническим раствором NaCl после замораживания-отогрева в среде с декстранами или ПЭГ, имеют значительную степень повреждения, а в оставшихся клетках наблюдаются существенные изменения осмотических свойств. Сочетание в криоконсерванте декстранов или ПЭГ с невысокими концентрациями глицерина или 1,2-ПД обеспечивает криозащитный эффект комбинированного состава, который противодействует повреждающим факторам при замораживании-отогреве и сохраняет осмотические свойства эритроцитов после их отмытия от криоконсерванта.

Выводы

В эритроцитах, замороженных-отогретых с декстраном или полиэтиленгликолем, наблюдаются увеличение скорости потока ионов H^+ по сравнению с интактными клетками и повышение осмотической хрупкости в среде с концентрацией NaCl 0,45–

17, 26, 27]. Most likely this is due to avoidance of significant supercooling in cells during freezing provided by the application of HES and DMSO combination [16, 27]. All these data testify that protection efficiency of various cryoprotectants is manifested within different ranges of negative temperatures and under different cooling rates. It may be suggested that each cryoprotectant as a part of combined medium would manifest a protective property under its "own" low temperature conditions and eventually the combined cryopreservation medium will provide an additive cryoprotection efficiency. Moreover the combined cryopreservatives reduce post-hypertonic stress during freeze-thawing providing the preservation of sufficient osmotic properties of cells.

Thus, the erythrocytes washed with NaCl isotonic solution after freeze-thawing in the medium with dextrans or PEG have a high damage rate and the remaining cells manifest significant changes in osmotic properties. The combining of dextrans or PEG with low concentrations of glycerol or 1,2-PD in cryopreservation medium provides effective cryoprotective properties of combined composition preventing damaging during freeze-thawing and preserving sufficient osmotic indices of erythrocytes after removing the cryopreservative.

Conclusions

In erythrocytes frozen-thawed with dextran or polyethylene glycol the increasing of H^+ ion flow rate if compared with the intact cells and the raising of osmotic fragility in the medium with 0.45–0.9% NaCl are revealed. Addition of glycerol or 1,2-PD into cryopreservation medium results in preservation of osmotic properties of frozen-thawed cells.

References

1. Ashmarin I.P., Vasil'ev I.P., Ambrosov V.A. Express methods of statistical analysis and planning of experiments.– Leninskograd, 1975.– 76 p.
2. Gordienko E.A. Physical grounds for low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 70 p.
3. Mezhdidov S.Kh., Belyaeva I.M., Vorotilin A.M., Moiseev V.A. Effect of combination of polyvinylpyrrolidone and 1,2-propanediol to the erythrocytes survival at cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 1996.– N2.– P. 22–25.
4. Mezhdidov S.Kh., Moiseev V.A. Effect of combination of high molecular cryoprotectants with 1,2-propanediol to the erythrocytes survival at cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 1995.– N3.– P. 46–48.
5. Mikhnovich E.P., Rozhdestvenskaya M.A., Nedel'sky G.T. Erythrocyte cryopreservation under $-196^{\circ}C$ with penetrating and non-penetrating substances // Actual Tasks of Cryobiology and Cryomedicine.– Kiev: Naukova Dumka, 1974.– P. 161–164.
6. Ostankov M.V. Theoretical grounds and experimental examination of efficiency of rapid two-stage freezing: Author's

0,9%. Если в криоконсервант дополнительно включать глицерин или 1,2-ПД, то существенных отклонений осмотических свойств замороженных-отогретых клеток не отмечается.

Литература

1. Ашмарин И.П., Васильев И.П., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов.– Л., 1975.– 76 с.
2. Гордиенко Е.А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– 70 с.
3. Межидов С.Х., Беляева И.М., Воротилин А.М., Моисеев В.А. Влияние сочетания поливинилпирролидона и 1,2-пропандиола на сохранность эритроцитов при криоконсервировании // Проблемы криобиологии.– 1996.– №2.– С. 22–25.
4. Межидов С.Х., Моисеев В.А. Влияние сочетания высокомолекулярных криопротекторов с 1,2-пропандиолом на сохранность эритроцитов при криоконсервировании // Проблемы криобиологии.– 1995.– №3.– С. 46–48.
5. Михнович Е.П., Рождественская М.А., Недельский Г.Т. Криоконсервация эритроцитов при –196°С с проникающими и непроникающими веществами // Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины: Сб. научных трудов.– Киев: Наук. думка, 1974.– С. 161–164.
6. Останков М.В. Теоретичне обґрунтування та експериментальна перевірка ефективності швидкого двоступінчастого заморожування: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.– Харків, 2001.– 20 с.
7. Рамазанов В.В. Влияние комбинированных сред на повреждение эритроцитов, замороженных с различным гематокритом // Проблемы криобиологии.– 2006.– Т. 16, №2.– С. 155–163.
8. Рамазанов В.В., Лупилова Н.А., Тодрин А.Ф., Бондаренко Т.П. Осмотическая модификация транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде // Проблемы криобиологии.– 1999.– №4.– С. 34–41.
9. Brahm J. Temperature-dependent changes of chloride transport kinetics in human red cells // J. Gen. Physiol.– 1977.– Vol. 70, N3.– P. 283–306.
10. Bursaux E., Hilly M., Bluze A., Poyart C. Organic phosphates modulate anion self-exchange across the human erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1984.– Vol. 777, N2.– P. 253–260.
11. Clapisson G., Salinas C., Malacher P. et al. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulphoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone // Bull. Cancer.– 2004.– Vol. 91, N4.– P. E97–102.
12. Connor W., Ashwood-Smith M.J. Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with polymers; possible mechanisms // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10, N6.– P. 488–496.
13. Farrant J., Walter C.A., Lee H., McGann L.E. Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing // Cryobiology.– 1977.– Vol. 14, N3.– P. 273–286.
14. Lionetti F.J., Hunt S.M., Gore J.M., Curby W.A. Cryopreservation of human granulocytes // Cryobiology.– 1975.– Vol. 12, N3.– P. 181–191.
15. Liu K.Y., Dong W.C., Wang Y.L. et al. Study on non-programmed process using dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch as cryoprotectants in cryopreservation of cord blood hematopoietic cells // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.– 2004.– Vol. 12, N5.– P. 670–673.
16. Luo K., Wu G., Wang Q. et al. Effect of dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch in the preservation of fractionated human marrow cells // Cryobiology.– 1994.– Vol. 31, N4.– P. 349–354.
17. Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. et al. Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants // Transplant Proc.– 2004.– Vol. 36, N4.– P. 1133–1134.
18. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates // Cryobiology.– 1977.– Vol. 14, N3.– P. 251–272.
19. Mazur P., Miller R.H. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose // Cryobiology.– 1976.– Vol. 13, N5.– P. 523–536.
20. Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. et al. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // Cryobiology.– 1997.– Vol. 35, N2.– P. 173–186.
21. Pitt R.E., Chandrasekaran M., Parks J.E. Performance of a kinetic model for intracellular ice formation based on the extent of supercooling // Cryobiology.– 1992.– Vol. 29, N3.– P. 359–373.
22. Rapatz G., Luyet B. Combined effects of freezing rates and of various protective agents on the preservation of human erythrocytes // Cryobiology.– 1968.– Vol. 4, N5.– P. 215–222.
23. Romano L., Passow H. Characterization of anion transport system in trout red blood cell // Am. J. Physiol.– 1984.– Vol. 246, N2.– P. 330–338.
24. Simon J.D., Albala B.B., Flinton L.J. et al. The cryopreservation of human lymphocytes // Cryobiology.– 1974.– Vol. 11, N6.– P. 543.
25. Sterling D., Reithmeier R.A., Casey J.R. A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers // J. Biol. Chem.– 2001.– Vol. 276, N51.– P. 47886–47894.
26. Stiff P.J., Koester A.R., Weidner M.K. et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without abstract of the thesis of candidate of biol. sciences.– Kharkov, 2001.– 20 p.

17. *Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. et al.* Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants // *Transplant Proc.*— 2004.— Vol. 36, N4.— P. 1133–1134.
18. *Mazur P.* The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates // *Cryobiology.*— 1977.— Vol. 14, N3.— P. 251–272.
19. *Mazur P., Miller R.H.* Survival of frozen-thawed human red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose // *Cryobiology.*— 1976.— Vol. 13, N5.— P. 523–536.
20. *Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. et al.* *In vitro* study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // *Cryobiology.*— 1997.— Vol. 35, N2.— P. 173–186.
21. *Pitt R.E., Chandrasekaran M., Parks J.E.* Performance of a kinetic model for intracellular ice formation based on the extent of supercooling // *Cryobiology.*— 1992.— Vol. 29, N3.— P. 359–373.
22. *Rapatz G., Luyet B.* Combined effects of freezing rates and of various protective agents on the preservation of human erythrocytes // *Cryobiology.*— 1968.— Vol. 4, N5.— P. 215–222.
23. *Romano L., Passow H.* Characterization of anion transport system in trout red blood cell // *Am. J. Physiol.*— 1984.— Vol. 246, N2.— P. 330–338.
24. *Simon J.D., Albala B.B., Flinton L.J. et al.* The cryopreservation of human lymphocytes // *Cryobiology.*— 1974.— Vol. 11, N6.— P. 543.
25. *Sterling D., Reithmeier R.A., Casey J.R.* A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers // *J. Biol. Chem.*— 2001.— Vol. 276, N51.— P. 47886–47894.
26. *Stiff P.J., Koester A.R., Weidner M.K. et al.* Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing // *Blood.*— 1987.— Vol. 70, N4.— P. 974–978.
27. *Stiff P.J., Murgu A.J., Zaroulis C.G., et al.* Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch // *Cryobiology.*— 1983.— Vol. 20, N1.— P. 17–24.
28. *Tsuruta T., Ishimoto Y., Masuoka T.* Effects of glycerol on intracellular ice formation and dehydration of onion epidermis // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*— 1998.— Vol. 858.— P. 217–226.
29. *Wagner C.T., Burnett M.B., Livesey S.A., Connor J.* Red blood cell stabilization reduces the effect of cell density on recovery following cryopreservation // *Cryobiology.*— 2000.— Vol. 41, N3.— P. 178–194.
30. *Woelders H., Chaveiro A.* Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes // *Cryobiology.*— 2004.— Vol. 49, N3.— P. 258–271.
31. *Woolgar A.E., Morris C.J.* Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on post-hypertonic haemolysis of human red blood cells // *Cryobiology.*— 1973.— Vol. 10, N1.— P. 82–86.

Accepted 13.10.2009

*Поступила 13.10.2009
Рецензент О.И. Гордиенко*